

# **ВЛИЯНИЕ ТИРОНА И ЕГО СОЧЕТАНИЯ С БЛОКАТОРОМ СИНТЕЗА МОНООКСИДА АЗОТА L-name НА КОРОНАРНЫЙ ПОТОК И СОКРАТИТЕЛЬНУЮ ФУНКЦИЮ МИОКАРДА НА ФОНЕ НОРМАЛЬНОГО И ИЗМЕНЕННОГО РЕДОКС-СОСТОЯНИЯ**

*Дорошенко А.С.*

*УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов  
медицинский университет»*

Эндотелиальные клетки миокарда в норме и при стрессе продуцируют целый ряд высокоактивных соединений кислорода и азота [3, 4, 7, 8]. Одной из наиболее реакционноспособных форм является супероксиданион ( $O_2^-$ ). Как было показано  $O_2^-$  - продуцируют широко представленные в клетках ферменты, такие как циклооксигеназа, липооксигеназа, NO-синтаза, цитохром P-450, гамма-глутамил-транспептидаза, и этот список продолжает расти. Можно предположить, что АФК играют весьма важную роль в регуляции деятельности клеток в качестве вторичных посредников, а в условиях стресса, когда наблюдается гиперпродукция АФК, и особенно в сочетании с гиперпродукцией NO, являются факторами агрессии [1, 5, 7].

Соотношение между тиоловыми и дисульфидными группами белков и пептидов вероятно, отражает баланс между выраженностью образования и действия АФК и эффективностью функционирования защитных систем клетки. Важная роль в поддержании редокс-равновесия принадлежит редокс-системе глутатиона (восстановленный /окисленный глутатион). Установлено, что SH-группы цистеиновых остатков ряда протеинов играют роль “редокс-сенсоров”. К таким молекулам относятся NO-синтазы, факторы транскрипции (AP-1, NF- $\kappa$ B, HIF-1), киназы (JNK, CDK, p 38 MAP киназа), фосфатазы, регуляторы внутриклеточного метаболизма кальция (рианодинотворный рецептор и L-тип кальциевых каналов), протенины АТФ-зависимых калиевых каналов, а также молекулы, регулирующие сократительную активность гладкой мышцы коронарных сосудов [3, 4, 6]. Учитывая важную роль редокс-состояния эндотелиоцитов и гладкомышечных клеток сосудистой стенки в регуляции их функциональной активности, а также его зависимость от образования активных форм кислорода можно предположить, что эффект супероксиданиона в регуляции внутриклеточных процессов может реализовываться через его воздействие на SH-группы. Следовательно, важным является выяснение биологиче-

ского действия супероксиданиона в зависимости от редокс-состояния клетки.

Целью настоящего исследования было изучить характер влияния тирона (химической ловушки супероксиданиона) на регуляцию тонуса коронарных сосудов и сократительную активность миокарда на фоне нормального и измененного редокс-состояния клеток коронарных сосудов и сердца.

Материалы и методы. Опыты были выполнены на 39 крысах-самках линии Вистар, массой 180- 240 г. Коронарный поток и сократительную функцию миокарда изучали на препаратах изолированного по Лангендорфу сердца, перфузируемого в условиях постоянного давления и сокращающегося в спонтанном ритме. Сердце перфузировали раствором Кребса - Хензелята при температуре 37°C. Постоянную температуру поддерживали при помощи ультратермостата UTU-4 (Польша). Перфузат не рециркулировал, что позволяло поддерживать его состав постоянным на протяжении всего опыта.

Величину объемной скорости коронарного потока (ОСКП) определяли по объему перфузионной жидкости, оттекающей через свободный правый и дренированный левый желудочки сердца за 10 секунд. В ходе опыта перфузионное давление (ПД) ступенчато повышали от 40 до 120 мм рт. ст. с шагом в 20 мм рт. ст. Коронарный расширительный резерв определяли как отношение между величиной коронарного потока, определенной после 60-ти секундного прекращения перфузии (максимальный гиперемический коронарный поток, МГКП), и исходным потоком. Степень изменения коронарного потока в условиях увеличения перфузионного давления, оценивали по индексу ауторегуляции, предложенному Е.Б.Новиковой (1972) [2]. В полость левого желудочка сердца через разрез в ушке левого предсердия вводили латексный баллончик, полость которого соединялась с электроманометром. Запись кривой внутрижелудочкового давления осуществляли электроманометром МХ-01 на одноканальном самописце Н 338-1. Для выявления зависимости между величиной коронарного потока и характером сократительной активности изолированного сердца рассчитывали показатель интенсивности перфузии миокарда как отношение ОСКП к произведению частоты сердечных сокращений в минуту на величину развиваемого внутрижелудочкового давления. Показатель интенсивности перфузии миокарда характеризовал количество перфузата, проходящегося на единицу функционирующего миокарда левого желудочка с массой 1 грамм. Поскольку

изолированное сердце сокращалось в спонтанном ритме, для исключения влияния частоты сердечных сокращений на величину развиваемого внутрижелудочкового давления рассчитывали показатель интенсивности функционирования структур миокарда.

$ИФС = (ЧСС \times РВД) / m$ , где ЧСС – частота сокращений изолированного сердца крысы, РВД - развиваемое внутрижелудочковое давление, m - сухая масса левого желудочка.

Каждый опыт состоял из двух этапов (табл. 1), во время которых перфузионное давление ступенчато увеличивали от 40 до 120 мм Нг с шагом в 20 мм Нг.

Таблица 1.

Характеристика групп экспериментальных животных и двух этапов перфузии сердца

N п/п	Название группы	Вещества, добавляемые в перфузионный раствор Кребса-Хензелята	
		На первом этапе эксперимента	На втором этапе эксперимента
1	Тирон	— (контроль)	Тирон
2	L-NAME+тирон	L-NAME	L-NAME+тирон
3	Тирон+метиленовая синька	Тирон	Тирон+метиленовая синька
4	L-NAME+тирон+L-аргинин	L-NAME+тирон	L-NAME+тирон+L-аргинин
6	L-бутионин-[S,R]-сульфоксимин	—	Тирон

Для выявления роли супероксиданиона, NO и растворимой гуанилатциклазы в регуляции тонуса коронарных сосудов в перфузионный раствор добавляли тирон (4,5-дигидрокси-1,3-бензенидисульфоновая кислота, 10 мМ, Sigma USA), метиловый эфир N-ω-нитро-L-аргинина (60 мкМ/л, Sigma USA,) L-аргинин (400 мкМ, Sigma USA), метиленовую синьку (20мкМ, Sigma USA). С целью воздействия на редокс-состояние миокарда и коронарных сосудов за 12 час до эксперимента животным внутрибрюшинно вводили L-бутионин-[S,R]-сульфоксимин (BSO, 2 ммоль/кг), необратимо ингибирующий ключевой фермент биосинтеза глутатиона - γ-глутамилцистеинсинтазу и тем самым снижающий концентрацию SH-групп. Цифровой материал обработали общепринятыми

методами вариационной статистики с использованием программы "Statistica 6.0".

**Результаты и обсуждение.** Добавление тирона в перфузионный раствор, сопровождалось увеличением ОСКП у всех животных в группе на 24-37% при ПД 60-120 мм.рт. ст. (рис. 1А), а также снижением индекса ауторегуляции на 33-48% при всех уровнях ПД и коронарного расширительного резерва на 26-33% при ПД 80 и 120 мм рт. ст. Тирон не оказывал влияния на величину МГКП. Развиваемое внутрижелудочковое давление в условиях действия тирона, уменьшилось на 38-47% при всех уровнях ПД. Диастолическое давление и частота сердечных сокращений, в ходе опыта не изменились. Интенсивность функционирования структур снизилась на 30-46%, а интенсивность перфузии миокарда возросла на 51-159% при всех уровнях ПД. Важно отметить, что после отмены введения тирона уже через несколько секунд наблюдалось к полное восстановление исходных показателей коронарного потока и сократительной функции миокарда. Таким образом, влияние тирона проявлялось только в момент его введения и характеризовалось ослаблением ауторегуляции коронарного потока, снижением тонуса коронарных сосудов и сократительной функции левого желудочка, что сопровождалось появлением феномена гипеперфузии миокарда. В связи с тем, что влияние тирона на коронарное кровообращение и сократительную функцию миокарда было сходным с влиянием избыточного количества NO, то на следующем этапе исследования мы изучили особенности действия тирона на фоне блокады синтеза NO.

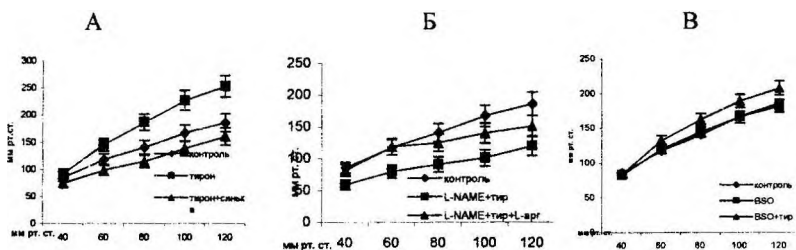


Рис. 1. Объемная скорость коронарного потока при разных уровнях перфузионного давления в изолированных сердцах крыс при введении тирона (А) на фоне блокады синтеза NO (Б), образования Ц-ГМФ (А), сочетанного действия блокатора синтеза NO и избытка L-аргинина (Б); а также после внутрибрюшинного L-бутионин-[S,R]-сульфоксимида (В)

Примечание: \* -  $p < 0,05$ , по сравнению с контролем

Внутрикоронарное введение L-NAME (блокада синтеза NO) сопровождалось снижением ОСКП в среднем на 39% при ПД 60-120 мм рт. ст., индекса ауторегуляции на 29-64%, коронарного расширительного резерва на 42%, главным образом, из-за снижения величин МГКП на 26-47%, при ПД 80-120 мм. рт. ст. Под влиянием L-NAME развиваемое внутрисердечное давление, частота сердечных сокращений, интенсивность функционирования структур, интенсивность перфузии миокарда и диастолическое давление достоверно не изменялись.

На фоне блокады синтеза NO, в отличие от контроля, под влиянием тирона объемная скорость коронарного потока и интенсивность перфузии миокарда не изменялись (рис. 1Б). Индекс ауторегуляции, МГКП, коронарный расширительный резерв уменьшались, что являлось характерным для действия только L-NAME. Однако, в условиях блокады синтеза NO, так же как и в контроле, под влиянием тирона наблюдалось снижение развиваемого внутрисердечного давления на 37-43% и интенсивности функционирования структур миокарда на 30-46%. Диастолическое давление и частота сердечных сокращений в ходе опыта не изменялись.

В связи с тем, что эффект тирона зависел от состояния системы синтеза NO, на следующем этапе изучили влияние тирона в условиях избытка субстрата синтеза NO L-аргинина и ингибитора реактивной гуанилатциклазы, метиленовой синьки. Совместное введение L-NAME и избытка L-аргинина сопровождалось полным восстановлением эффекта тирона на коронарный кровоток и сократительную функцию миокарда (рис. 1Б). Следовательно, коронародилататорное и кардиодепрессорное влияние тирона могло быть связано с действием NO, что подтвердилось блокадой образования цГМФ метиленовой синькой. Так, при введении тирона на фоне метиленовой синьки (ингибирование образования цГМФ), так же, как и в условиях блокады синтеза NO, характерного для действия тирона увеличения ОСКП не наблюдалось. Коронарный расширительный резерв снижался на 22% в связи с уменьшением абсолютных значений МГКП. На фоне метиленовой синьки под влиянием тирона отмечалось выраженное снижение развиваемого внутрисердечного давления на 32-55% при всех уровнях ПД. Интенсивность функционирования структур при сочетании введения метиленовой синьки и тирона снижалась в среднем на 13% больше, чем при действии только одного тирона. Интенсивность перфузии миокарда в этих условиях возросла на 51-214% при всех уровнях ПД. Диастолическое давление в ходе опыта изменялось

мало и составляло  $6 \pm 2$  мм рт. ст. Таким образом, связывание супероксид аниона в условиях интактной системы синтеза монооксида азота оказывает выраженное коронародилататорное действие. Это дает нам возможность предположить, что тирон оказывает влияние на тонус коронарных сосудов, в первую очередь, изменяя функцию эндотелиоцитов, так как влияние супероксиданиона и NO оказались взаимосвязанными. В то же время, супероксид и монооксид азота также участвуют в регуляции сократительной функции миокарда. Однако их взаимодействие оказывается гораздо менее слабым.

Внутрибрюшинное введение L-бутионин-[S,R]-сульфоксимины (снижает уровень восстановленного глутатиона) контрольным животным не сопровождалось изменением ОСКП (рис. 1В), МГКП и коронарного расширительного резерва, однако индекс ауторегуляции снижался при всех уровнях ПД на 28-60%, что свидетельствует об уменьшении способности сосудов сердца отвечать расслаблением на их растяжение после увеличения внутрисосудистого давления. Развиваемое давление в этой группе животных снижалось на 10-32% при ПД 40-60 мм рт. ст., а частота сердечных сокращений резко возросла - в среднем на 50% при всех уровнях ПД. Несмотря на снижение развиваемого внутрижелудочкового давления из-за возросшей частоты сердечных сокращений не наблюдалось изменения интенсивности функционирования структур миокарда и изменения интенсивности его перфузии.

Внутрикоронарное введение тирона на фоне снижения содержания глутатиона сопровождалось увеличением ОСКП, но это увеличение ОСКП было в среднем на 11% менее выраженным, чем в контроле. Индекс ауторегуляции в этой группе животных снижался в значительно большей степени (на 83% больше) чем у контрольных крыс. Максимальный гиперемический коронарный поток не изменялся, но коронарный расширительный резерв снижался на 27-35% при ПД 80 и 120 мм рт. ст., по сравнению с контролем, что было связано со снижением базального тонуса коронарных сосудов. Развиваемое внутрижелудочковое давление снижалось в той же степени, как и при действии только тирона (на 38-41%). В связи с тем, что после внутрикоронарного введения тирона частота сердечных сокращений по-прежнему оставалась на 28-53% более высокой, чем в контроле, интенсивность функционирования структур миокарда снижалась всего на 39-52%, а интенсивность перфузии миокарда возрастала в среднем на 94% при всех уровнях ПД.

Таким образом, результаты экспериментов демонстрируют важное значение редокс-состояния эндотелиоцитов в регуляции сосудистого тонуса; (2) регуляторную роль  $O_2^-$  в условиях нормального, так и сниженного содержания глутатиона, которая заключается во взаимодействии его с NO; (3) снижение эффекта связывания  $O_2^-$  в условиях уменьшения содержания глутатиона из-за видоизменения его роли модулятора биологической активности NO, и как следствие тонуса сосудов сердца

Работа выполнена при поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (Договор Б03-240 от 15 апреля 2003г.)

#### Литература

1 Дорошенко А.С., Солодков Д.А. Изменение белковых и небелковых SH-групп в миокарде крыс при иммобилизационном стрессе различной продолжительности. // Тез. докл. II международной научно-практической конференции "Студенческая медицинская наука XXI века" - Витебск, 2002 - С.22-23.

2 Новикова Е.Б. Об ауторегуляции в коронарной системе. // Физиол. журнал N 1 1972, с.61-74.

3 Шебеко В.И. Эндотелий и система комплемента. // Витебск: ВГМУ, 1999 - С. 108-116.

4 Abe J-i., Berk B. C. Reactive oxygen species as mediators of signal transduction in cardiovascular disease // Trends Cardiovasc. Med. - 1998. - Vol.8. - P.59-64.

5 Kunsch C., Medford R. Oxidative stress as a regulator of gene expression in the vasculature. // Circ Res. 1999. - Vol. 85. - P. 753-766.

6 Kamata H., Hirata H. Redox regulation of cellular function // Cell Signal. -1999. - Vol.11, №1. - P. 1-14.

7. Vanhoutte P. Endothelium derived free radicals: for worse and for better. // J. Clin Invest. - 2001-Vol. 107-N 1-P 23-25.

8. Wolin M. Interactions of oxidants with vascular signaling systems. // Arterioscler Tromb. Vasc Biol. 2000. - Vol. 20. - P. 1430-1442.